



### Handbuch für Präanalytik

**Zielsetzung:**

Mit dem hier vorliegenden Handbuch sollen

- **allen Einsendern** Hinweise für den Versand von Primärproben, und
- **einsendenden Pathologen** Hinweise zur Vorbereitung von Proben für die molekularpathologische Diagnostik

am Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Ulm gegeben werden.


<i>Prüfungs- und Freigabeprotokoll</i>	<i>Name:</i>	<i>Erstellt am:</i>	<i>Unterschrift:</i>
	Verfasser: Prof. Dr. R. Marienfeld	15.04.2014	
	<b>GEPRÜFT VON: Name:</b>	<b>Datum:</b>	<b>Unterschrift:</b>
	QMB: Karola Dorsch	15.04.2014	
	<b>Leitung zur Freigabe:</b> Prof. Dr. Peter Möller	15.04.2014	

Ersetzt:	<b>VA-PA 4 – Handbuch für Präanalytik</b>	<b>Version: 2</b>	<b>Datum: 19.10.2012</b>
----------	---	-------------------	--------------------------

**Inhalt**

<b>1. ZIEL UND ZWECK</b> .....	<b>3</b>
<b>2. ZUSTÄNDIGKEIT</b> .....	<b>3</b>
<b>3. GELTUNGSBEREICH</b> .....	<b>3</b>
<b>4. MITGELTENDE UNTERLAGEN</b> .....	<b>3</b>
<b>5. VERFAHRENSBESCHREIBUNG</b> .....	<b>3</b>
5.1.  GENERELLE HINWEISE ZUM VERSAND VON PRIMÄRPROBEN .....	3
5.2.  INFORMATIONEN FÜR DIE EINSENDENDEN PATHOLOGEN.....	4
5.3.  LEISTUNGSKATALOG .....	4
5.3.1. <i>Mutationsanalysen</i> .....	4
5.3.2. <i>Erregernachweise</i> .....	5
5.3.3. <i>Klonalitätsanalysen bei Lymphomverdacht (BZR- und TZR-Rearrangement)</i> .....	6
5.3.4. <i>FISH-Analysen</i> .....	6
5.3.5. <i>Sonstige Untersuchungen</i> .....	8
5.4.  PROBENANNAHME.....	8
5.5.  NOTWENDIGE INFORMATIONEN AUF DEM EINSENDESCHIN UNTERSUCHUNGSSCHIN .....	8
5.6.  HINWEISE ZUR FIXIERUNG DES GEWEBEMATERIALS .....	9
5.7.  HINWEISE ZUR ENTKALKUNG VON KNOCHENPROBEN .....	9
5.8.  ALLGEMEINE HINWEISE ZUR DEN MOLEKULARPATHOLOGISCHEN ANALYSEN .....	10
5.8.1. <i>Spezifische Hinweise für Mutationsanalysen</i> .....	11
5.8.2. <i>Spezifische Hinweise für die FISH-Analysen</i> .....	11
5.8.3. <i>Spezifische Hinweise für die Erregerdiagnostik</i> .....	12

Bearbeiter/in	Freigabe (QMB/Leitung)	Version/Datum	Seite
Prof. Dr. R. Marienfeld	K. Dorsch      Prof. Dr. P. Möller	03/15.04.2014	<b>1 von 13</b>


 <b>Universitätsklinikum Ulm Institut für Pathologie</b>	<b>Verfahrensanweisung</b>
	<b>Präanalytik</b>
<b>VA-PA 4</b>	

5.8.4.	Spezifische Hinweise für die Klonalitätsanalysen (Lymphomdiagnostik).....	12
5.8.5.	Spezifische Hinweise für die MSI-Analyse .....	12
5.9.	VERSAND DER INSPEKTIONSBERICHTE .....	12

<b>Auf Aktualität geprüft am:</b>	<b>Durch:</b>
<b>Verteiler:</b>	
ORIGINAL:	<b>QMB</b>
Kopien:	<b>nach Verteilerschlüssel (s. FB-LD 1)</b>

Bearbeiter/in	Freigabe (QMB/Leitung)	Version/Datum	Seite
<i>Prof. Dr. R. Marienfeld</i>	<i>K. Dorsch</i> <i>Prof. Dr. P. Möller</i>	<i>03/15.04.2014</i>	<b>2 von 13</b>

Für die Übereinstimmung mit der im „QM-Arbeitsplatz“ hinterlegten Kopie trägt jeder Mitarbeiter selbst die Verantwortung.

	<b>Universitätsklinikum Ulm Institut für Pathologie</b>	<b>Verfahrensanweisung</b>
<b>VA-PA 4</b>		<b>Präanalytik</b>

## 1. Ziel und Zweck

Dieses Handbuch soll dem Einsender von Gewebeproben zur Durchführung einer molekularpathologischen Diagnostik als Leitfaden für die Behandlung der zu versendenden Proben dienen. Für die Durchführung der molekularpathologischen Diagnostik ist in der Regel die Einsendung von Formalin-fixierten und Paraffin-eingebetteten Material (FFPE-Material) erforderlich. Bedingt durch die Empfindlichkeit der diagnostischen Verfahren ist eine optimale Qualität des eingesandten Materials erforderlich.

Das vorliegende Handbuch soll den einsendenden Pathologen, die Proben selbst vorbereiten (z.B. Formalin-Fixieren oder entkalken) als Entscheidungshilfe dienen, wie die Vorbereitung der Proben durchgeführt werden kann.

Es erhebt ferner keinen Anspruch auf Vollständigkeit und muss dem jeweiligen Kenntnisstand der Wissenschaft angepasst werden.

## 2. Zuständigkeit

Sekretariat	Schreiben der Befunde, Versand der Befunde, Rückfragen
Eingangslabor	Probenannahme, -kontrolle
Pathologen	Identifizierung der Analyseareale, Befunderstellung, medizinische Validation
MTA	Durchführung der molpath. Analysen

## 3. Geltungsbereich

Institut für Pathologie, Molekularpathologie

## 4. Mitgeltende Unterlagen


VA-VD 2	Klonalitätsanalyse
VA-VD 3	Mutationsanalyse
VA-VD 4	FISH-Analysen
VA-VD 5	Erreger-Nachweise
VA-VD 6	Erregernachweise aus Myokardbiopsien
VA-VD 7	Gewebeschnitt-Herstellung und -Färbung
VA-PA 1	Probenannahme und Auftragseingabe
VA-PA 10	Befunderstellung und -versand
VA-PA 2	Unvollständiges Probenmaterial
VA-PA 3	Probenbehandlung allgemein

## 5. Verfahrensbeschreibung

### 5.1. Generelle Hinweise zum Versand von Primärproben

Für den Versand von Primärproben können dem Einsender

Bearbeiter/in	Freigabe (QMB/Leitung)	Version/Datum	Seite
<i>Prof. Dr. R. Marienfeld</i>	<i>K. Dorsch</i>	<i>Prof. Dr. P. Möller</i>	<b>3 von 13</b>

 <b>Universitätsklinikum Ulm</b> <b>Institut für Pathologie</b>	<b>Verfahrensanweisung</b>
<b>VA-PA 4</b>	<b>Präanalytik</b>

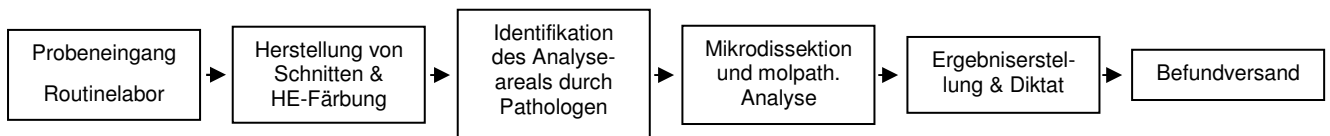
- Gefäße (gefüllt mit 4%iger neutraler Formalinlösung nur bis einer Gefäßgröße von 100ml),
- Einsendescheine,
- und Versandmaterial,

zur Verfügung gestellt werden. Bitte erfragen Sie nähere Informationen bei Frau Riede (0731/500-56359) oder fordern Sie eine Versandmaterial-Anforderung per Fax (0731/500-56384) an.

## 5.2. Informationen für die einsendenden Pathologen

Bitte senden Sie für die Durchführung von molekularpathologischen Untersuchungen nach Möglichkeit das bereits fertige FFPE-Material als **Blöcke** ein. Im Institut werden die notwendigen weiterführenden Schritte durchgeführt (s. Abb. 1). Je nach gewünschter Untersuchung (Leistungskatalog, s. u.) sind aber unterschiedliche Details zu beachten, welche weiter unten kurz dargestellt sind.

Abb. 1 Ablaufschema molekularpathologische Analysen



Ansprechpartner			
<b>Mutationsanalytik</b>	Prof. Dr. Ralf Marienfeld	Tel.: 0731 500 56306	ralf.marienfeld@uniklinik-ulm.de
<b>Erregernachweis/ Klonalitätsanalytik</b>	PD Dr. Frank Leithäuser	Tel.: 0731 500 56380	frank.leithaeuser@uniklinik-ulm.de
<b>FISH-Analytik</b>	Prof. Dr. Thomas Barth	Tel.: 0731 500 56300	thomas.barth@uniklinik-ulm.de


## 5.3. Leistungskatalog

Folgende Molekularpathologische Analysen sind am Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Ulm etabliert (siehe auch FB-EL 1). Gerne sind wir bereit nach vorheriger Absprache neue Analysen einzuführen.

### 5.3.1. Mutationsanalysen

Nachweis	Methodik	Indikation
<b>EGFR-Mutationsanalyse (Exon 18,19, 20, 21)</b>	<b>PCR/Sanger-Sequenzierung</b>	<b>Fortgeschrittenes Bronchialkarzinom, Nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom, Kolon-Karzinom u.a.</b>
<b>C-KIT-Mutationsanalyse (Exon 9, 11, 13, 17)</b>	<b>PCR/Sanger-Sequenzierung</b>	<b>GIST / Mastozytose, Melanom</b>
<b>C-KIT-Mutationsanalyse (Exon 10)</b>	<b>PCR/Sanger-Sequenzierung</b>	<b>GIST / Mastozytose, Melanom</b>

Bearbeiter/in	Freigabe (QMB/Leitung)	Version/Datum	Seite
Prof. Dr. R. Marienfeld	K. Dorsch	Prof. Dr. P. Möller	03/15.04.2014
			<b>4 von 13</b>


 <b>Universitätsklinikum Ulm</b> <b>Institut für Pathologie</b>	<b>Verfahrensanweisung</b>
	<b>Präanalytik</b>

<b>JAK2-Mutationsanalyse (Exon 12, nt 1849)</b>	<b>PCR/Pyro-Sequenzierung</b>	<b>Myeloproliferative Neoplasien</b>
<b>BRAF-Mutationsanalyse (Exon 15, Codon 600)</b>	<b>PCR/Pyro-Sequenzierung</b>	<b>Schilddrüsenkarzinom, Colonkarzinom, Melanom</b>
<b>K-RAS-Mutationsanalyse (Exon 2, 3 und 4)</b>	<b>PCR/Pyro-Sequenzierung</b>	<b>Kolorektale Karzinome, Nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom u.a.</b>
<b>PDGFRa-Mutationsanalyse (Exon 18)</b>	<b>PCR/Sanger-Sequenzierung</b>	<b>GIST / Mastozytose, Melanom</b>
<b>IDH1/2-Mutationsanalyse</b>	<b>PCR/Pyro-Sequenzierung</b>	<b>Astrozytome, Oligodendrogliome und Anaplastischen Gliome, Glioblastom</b>
<b>N-RAS-Mutationsanalyse (Codon Exon 2, 3 und 4)</b>	<b>PCR/Pyro-Sequenzierung</b>	<b>Malignome u.a.</b>
<b>APC-Mutationsanalyse</b>	<b>PCR/Sanger-Sequenzierung</b>	<b>familiäre adenomatöse Polyposis (FAP) u.a.</b>
<b>NPM1-Mutationsanalyse</b>	<b>PCR/Sanger-Sequenzierung</b>	<b>akute myeloische Leukämie</b>
<b>CTNNB1-Mutationsanalyse</b>	<b>PCR/Sanger-Sequenzierung</b>	<b>familiäre adenomatöse Polyposis (FAP) u.a.</b>
<b>C-MET-Mutationsanalyse</b>	<b>PCR/Sanger-Sequenzierung</b>	<b>Fortgeschrittenes Bronchialkarzinom, Nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom, Kolon-Karzinom u.a.</b>
<b>FGFR3-Mutationsanalyse</b>	<b>PCR/Sanger-Sequenzierung</b>	<b>u.a. Melanom</b>
<b>GNAS1-Mutationsanalyse</b>	<b>PCR/Sanger-Sequenzierung</b>	<b>z.B. V.a. fibröse Dysplasie</b>
<b>EHZ2 (Exon 2-20)</b>	<b>PCR/Sanger-Sequenzierung</b>	<b>Lymphome</b>
<b>Her2neuV695</b>	<b>PCR/Pyro-Sequenzierung</b>	<b>Li Fraumeni Syndrom</b>
<b>PIK3CA-Mutationsanalyse</b>	<b>PCR/Sanger-Sequenzierung</b>	<b>Kolorektale Karzinome</b>

### 5.3.2. Erregernachweise

<b>Nachweis</b>	<b>Methodik</b>	<b>Indikation</b>
<b>HSV-Nachweis</b>	<b>PCR</b>	<b>HSV-Infektion, ulzeröse Ösophagitiden u.a.</b>
<b>HHV8-Nachweis</b>	<b>Nested PCR</b>	<b>Kaposi-Sarkom, der Morbus Castleman u.a.</b>
<b>EBV-Nachweis</b>	<b>Nested PCR</b>	<b>nasopharyngeales Karzinom, aggressive B-Zell-Lymphome u.a.</b>
<b>HPV-Nachweis+Typisierung</b>	<b>PCR/Sanger-Sequenzierung</b>	<b>Zervixkarzinom u.a.</b>

Bearbeiter/in	Freigabe (QMB/Leitung)	Version/Datum	Seite
<i>Prof. Dr. R. Marienfeld</i>	<i>K. Dorsch</i>	<i>Prof. Dr. P. Möller</i>	<b>5 von 13</b>

 <b>Universitätsklinikum Ulm</b> <b>Institut für Pathologie</b>	<b>Verfahrensanweisung</b>
	<b>Präanalytik</b>

TBC-Nachweis	Nested PCR	Tuberkulose
Treponema-Pall.-Nachweis	Nested PCR	Syphilis

### 5.3.3. Klonalitätsanalysen bei Lymphomverdacht (BZR- und TZR-Rearrangement)

Nachweis	Methodik	Indikation
IgH-Analyse (Fr1, Fr2, Fr3)	Multiplex PCR + Kapillarelektrophorese	V. a. B-Zell-Lymphom
Igκ-Analyse (BZR, IgH)	Multiplex PCR + Kapillarelektrophorese	V. a. B-Zell-Lymphom
TCRγ-Analyse	Multiplex PCR + Kapillarelektrophorese	V. a. T-Zell-Lymphom
TCRβ-Analyse	Multiplex PCR + Kapillarelektrophorese	V. a. T-Zell-Lymphom

### 5.3.4. FISH-Analysen


Nachweis	Methodik	Indikation
MDM2-FISH	Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung	V. a. Liposarkom
CDK4-FISH	Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung	V. a. Liposarkom
NMYC-FISH	Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung	V. a. Neuroblastom
HER2-FISH	Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung	V. a. Mamma-Karzinom
P53-FISH	Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung	V. a. Chronische Lymphatische Leukämie, Multiples Myeloma u.a.
C-MET	Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung	Fortgeschrittenes Bronchialkarzinom, Nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom, Kolon-Karzinom u.a.
1p36/1q25	Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung	Astrocytom, Oligodendrogliom Oligoastrocytom
ALK-FISH	Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung	V. a. ALCL
CMYC-FISH	Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung	V. a. Non-Hodgkin-Lymphom, Multiples Myelom, Burkitt-Lymphom u.a.
IGH-FISH	Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung	V. a. Non-Hodgkin-Lymphom (insb. Burkitt), Multiples Myelom
BCL2-FISH	Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung	V. a. Follikuläres Lymphom
BCL6-FISH	Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung	V. a. Non-Hodgkin-Lymphom, DLBCL, Burkitt-Lymphom, etc.
SS18-FISH	Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung	V.a. Synovialsarkom

Bearbeiter/in	Freigabe (QMB/Leitung)	Version/Datum	Seite
Prof. Dr. R. Marienfeld	K. Dorsch	Prof. Dr. P. Möller	03/15.04.2014
			<b>6 von 13</b>



<b>MALT1-FISH</b>	<b>Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung</b>	<b>V. a. MALT-Lymphom</b>
<b>FOXO1A-FISH</b>	<b>Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung</b>	<b>V. a. Rhabdomyosarkom u.a.</b>
<b>EWSR1-FISH</b>	<b>Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung</b>	<b>V. a. Ewing-Sarkom</b>
<b>DDIT3-FISH</b>	<b>Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung</b>	<b>V. a. myxoides Liposarkom</b>
<b>BCL10-FISH</b>	<b>Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung</b>	<b>V. a. MALT-Lymphom u.a.</b>
<b>CCND1-FISH</b>	<b>Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung</b>	<b>V. a. Mantelzell-Lymphom</b>
<b>Ig lambda-FISH</b>	<b>Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung</b>	<b>Variante Translokationen (t(8; 22)), z. B. bei Burkitt-Lymphom</b>
<b>Ig kappa-FISH</b>	<b>Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung</b>	<b>Variante Translokationen (t (2;8)), z. B. bei Burkitt-Lymphom</b>
<b>FUS-FISH</b>	<b>Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung</b>	<b>Sarkome, AML, Histiozytome</b>
<b>ETV6-FISH</b>	<b>Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung</b>	<b>Akute lymphoblastische Leukämie, infantiles Fibrosarkom</b>
<b>Pax3-FISH</b>	<b>Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung</b>	<b>V.a. Rhabdomyosarcom</b>
<b>Pax7-FISH</b>	<b>Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung</b>	<b>V.a. Rhabdomyosarcom</b>
<b>USP6-FISH</b>	<b>Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung</b>	<b>V.a. Aneurysmatische Knochenzyste</b>
<b>ROS1-FISH</b>	<b>Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung</b>	<b>Fortgeschrittenes Bronchialkarzinom, Nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom</b>
<b>RET-FISH</b>	<b>Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung</b>	<b>Fortgeschrittenes Bronchialkarzinom, Nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom</b>
<b>NR4A3-FISH</b>	<b>Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung</b>	<b>Extraskeletale myxoide Chondrosarcome (EMCs)</b>
<b>FGFR1-Analyse</b>	<b>Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung</b>	<b>Fortgeschrittenes Bronchialkarzinom, Nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom, u.a.</b>
<b>CCND1/IGH-FISH</b>	<b>Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung</b>	<b>V. a. Mantel-Zell-Lymphom, Multiples Myelom, MALT-Lymphom</b>
<b>CMYC/IGH-FISH</b>	<b>Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung</b>	<b>V. a. Non-Hodgkin-Lymphom, Multiples Myelom, Burkitt-Lymphom u.a.</b>
<b>IGH/BCL2-FISH</b>	<b>Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung</b>	<b>V. a. Non-Hodgkin-Lymphom, DLBCL, Burkitt-Lymphom, etc.</b>
<b>MALT1/IGH-FISH</b>	<b>Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung</b>	<b>V. a. Non-Hodgkin-Lymphom, MALT-Lymphom</b>
<b>MALT1/API2-FISH</b>	<b>Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung</b>	<b>V. a. Non-Hodgkin-Lymphom, MALT-Lymphom</b>

Bearbeiter/in	Freigabe (QMB/Leitung)	Version/Datum	Seite
<i>Prof. Dr. R. Marienfeld</i>	<i>K. Dorsch</i>	<i>Prof. Dr. P. Möller</i>	<b>7 von 13</b>

 <b>Universitätsklinikum Ulm</b> <b>Institut für Pathologie</b>	<b>Verfahrensanweisung</b>
	<b>Präanalytik</b>

<b>BCR/ABL-FISH</b>	<b>Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung</b>	V. a. chronische myeloische Leukämie
<b>FGFR3/IgH-FISH</b>	<b>Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung</b>	V. a. Multiples Myelom
<b>ALK/EML4-FISH</b>	<b>Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung</b>	Fortgeschrittenes Bronchialkarzinom, Nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom
<b>COL1A1/PDGFB (17; 22)-FISH</b>	<b>Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung</b>	V.a. Dermatofibrosarcoma Protuberans
<b>X, Y Chromos. FISH</b>	<b>Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung</b>	
<b>Melanom Sondensatz (RReB1 + 6 cent, MYB, CCND1) FISH</b>	<b>Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung</b>	<b>Melanom</b>

### 5.3.5. Sonstige Untersuchungen

Nachweis	Methodik	Indikation
<b>MGMT-Promotormethylierung</b>	<b>Bisulfitkonversion/Pyro-Sequenzierung</b>	<b>Glioblastom</b>
<b>MSI (bei HNPCC-Verdacht)</b>	<b>Multiplex-PCR/Kapillar-Elektrophorese</b>	<b>HNPCC-Verdacht</b>
<b>STR-Analyse zur Identitätsprüfung</b>	<b>Multiplex-PCR/Kapillar-Elektrophorese</b>	<b>Identitätsprüfung von Gewebe</b>

### 5.4. Probenannahme

Es werden zu folgenden Zeiten – oder nach vorheriger Absprache - Proben angenommen und bearbeitet:

Montag	07.00 Uhr bis 16.00 Uhr
Dienstag	07.00 Uhr bis 16.00 Uhr
Mittwoch	07.00 Uhr bis 16.00 Uhr
Donnerstag	07.00 Uhr bis 16.00 Uhr
Freitag	07.00 Uhr bis 16.00 Uhr


### 5.5. Notwendige Informationen auf dem Einsendeschein Untersuchungsschein

Folgende Angaben sollen auf dem Untersuchungsschein leserlich vermerkt werden:

- Nachname, Vorname, Geburtsdatum, Adresse des Patienten
- Vertragsarzt Nummer, Krankenhaus, ggf. Station
- Absender (Adresse des einsendenden Arztes)
- Einsendedatum
- Untersuchungsmaterial/Klinische Diagnose
- Ergebnisse von histologischen Voruntersuchungen / Vorbefunde
- Klinische Fragestellung bzw. spezifischer Untersuchungsauftrag

Bearbeiter/in	Freigabe (QMB/Leitung)	Version/Datum	Seite
<i>Prof. Dr. R. Marienfeld</i>	<i>K. Dorsch</i>	<i>Prof. Dr. P. Möller</i>	<b>8 von 13</b>



	<b>Universitätsklinikum Ulm Institut für Pathologie</b>	<b>Verfahrensanweisung</b>
	<b>VA-PA 4</b>	<b>Präanalytik</b>

- Anatomischer Entnahmeort der Probe/ des Untersuchungsguts
- (Angaben über Bestrahlung des Tumors und ggf. Vorbehandlung der Probe)

Bei fehlenden oder widersprüchlichen Angaben erfolgt nach Möglichkeit eine sofortige Rückfrage beim Einsender.

### 5.6. Hinweise zur Fixierung des Gewebematerials

Die Formalin-Fixierung des Gewebes ist ein kritischer Schritt, der die nachfolgenden molekularpathologischen Untersuchungen wesentlich beeinflussen kann, da z. B. eine „Überfixierung“ des Gewebes eine stark beeinträchtigte DNA-Qualität nach sich ziehen kann. Um Ihnen als Einsender eine kleine Hilfe an die Hand zu geben, sind im Folgenden die Verfahrensweisen zur Herstellung von FFPE-Materialien im Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Ulm dargestellt:

#### **Verfahren:**

Die Gewebeproben werden in geeignete Behälter für ca. 12 Stunden (abhängig von Art und Größe der Probe) in eine neutral gepufferte 4%igen Formalin-Lösung bei Raumtemperatur gelegt. Es wird empfohlen für die Fixierung ca. das 20fache Volumen des zu fixierenden Gewebes zu verwenden.

Geeignete neutral gepufferten 4%igen Formalin-Lösungen sind kommerziell erhältlich. Geeignete Lösungen sind z. B.:

Formaldehyd 4% gepuffert methanolarm (R. Langenbrinck Labor- und Medizintechnik)

Formaldehyd-Lösung gepuffert (Fisnar)

### 5.7. Hinweise zur Entkalkung von Knochenproben

Vor der Paraffin-Einbettung von Knochengewebe, wie z.B. von Knochenstanzen, erfolgt in der Regel die Entkalkung des Gewebes. Auch der Entkalkungsprozess bzw. die dafür verwendeten Lösungen und Reagenzien können eventuell nachfolgende molekularpathologische Analysen wesentlich beeinflussen. Um Ihnen als Einsender eine kleine Hilfe an die Hand zu geben, sind im Folgenden die Verfahrensweisen und Materialien dargestellt, die im Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Ulm für die Entkalkung von Knochengewebe für die nachfolgende FFPE-Materialherstellung bzw. molekularpathologische Analysen angewendet werden.


#### **Verfahren:**

Das Knochengewebe wird in EDTA-Entkalkungs-Lsg. gelegt (Probe muss vollständig bedeckt sein) und darin für mindestens 18–24 Stunden **bei 37°C** belassen. Nach 24 Stunden erfolgt eine Sicht- und Druckkontrolle. Falls die Entkalkung noch nicht vollständig abgeschlossen ist, dann wird die Gewebeprobe so lange in der EDTA-Entkalkungs-Lsg. belassen, bis der Prozess abgeschlossen ist (mindestens aber für weitere 24 Stunden).

Wichtig: Die EDTA-Entkalkungs-Lsg. muss jeweils nach 24 Stunden ausgetauscht werden.

#### **EDTA-Entkalkungslsg. (2% EDTA in neutral gepufferten Formalin), für 2l Ansatz**

Bearbeiter/in	Freigabe (QMB/Leitung)	Version/Datum	Seite
Prof. Dr. R. Marienfeld	K. Dorsch	Prof. Dr. P. Möller	03/15.04.2014
			<b>9 von 13</b>

 <b>Universitätsklinikum Ulm Institut für Pathologie</b>	<b>Verfahrensanweisung</b>		
	<b>Präanalytik</b>		

EDTA (z.B. Triplex III, Merck, 1.08418.5000)	400g
4%ige Formalin-Lsg (z.B. von Fishar, siehe unten)	2000ml
NaOH-Plättchen	ca. 40g

Der pH-Wert wird mit NaOH (fest, Lösung) auf 7,2 – 7,4 eingestellt.

**Wichtig: Bitte vermeiden Sie bei der Entkalkung den Einsatz von Säuren, da dies zu einer starken Beeinträchtigung der DNA-Qualität führt.**

### 5.8. Allgemeine Hinweise zur den molekularpathologischen Analysen

Bitte senden Sie uns nach Möglichkeit **Blöcke** zu, von denen die notwendigen Schnitte hergestellt werden können.

#### **Nachweis und Verdünnungsgrenzen**

Wichtige Punkte, die in einem engen Zusammenhang mit den benötigten Materialmengen stehen, sind die Nachweis- und Verdünnungsgrenzen der durchgeführten molekularpathologischen Analysen. Grob gesagt handelt es sich bei der Nachweisgrenze um den Anteil an spezifischer DNA (z. B. mutierter DNA oder Erreger-DNA) in der eingesetzten Gesamt-DNA.

Die Verdünnungsgrenze ist die Probenmenge (z. B. ng DNA, etc.), die benötigt wird, um eine Analyse (PCR ± nachfolgende Sequenzierung) erfolgreich durchführen zu können. Die Verdünnungsgrenze ist sehr variabel und hängt von folgenden Faktoren ab:


- Größe der Gewebeprobe bzw. des Analyseareals.
- Art, Herkunft und Vorbehandlung der Proben.
- Störfaktoren (s.u.).
- Analysespezifische Variabilität.

#### **Störfaktoren**

Störfaktoren sind allgemeine Faktoren, die den Erfolg der molekularpathologischen Analysen negativ beeinflussen oder gar verhindern können.

- „Überfixierung“
- Entkalkungsprozess
- PCR-inhibierende Substanzen in der Gewebeprobe (z. B. Melanin, Hämoglobin, etc.)
- Bestrahlung des Patienten/Tumors
- Nekrose des Gewebes

Bearbeiter/in	Freigabe (QMB/Leitung)		Version/Datum	Seite
<i>Prof. Dr. R. Marienfeld</i>	<i>K. Dorsch</i>	<i>Prof. Dr. P. Möller</i>	<i>03/15.04.2014</i>	<b>10 von 13</b>

	<b>Universitätsklinikum Ulm Institut für Pathologie</b>	<b>Verfahrensanweisung</b>
<b>VA-PA 4</b>	<b>Präanalytik</b>	

### 5.8.1. Spezifische Hinweise für Mutationsanalysen

Die oben aufgeführten Mutationsanalysen erfolgen in der Regel durch eine PCR-vermittelte Amplifikation des zu untersuchenden DNA-Bereichs gefolgt von entweder einer Sanger-Sequenzierung oder einer Pyro-Sequenzierung. Im Folgenden sind die wichtigsten Punkte zusammengefasst, die Sie bei der Beauftragung von molekularpathologischen Untersuchungen durch das Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Ulm beachten müssen:

#### **Nachweisgrenzen:**

- 10-20% mutierte DNA bei Nachweisen, die mittels Sanger-Sequenzierungen durchgeführt werden.
- 5-10% mutierte DNA bei Nachweisen, die mittels Pyro-Sequenzierungen durchgeführt werden.

Das bedeutet, dass möglichst Proben mit hohem relevantem Tumor-Anteil (**nach Möglichkeit sollte ein 50-80% eines Areal des Schnittes Tumorzellen sein**) ausgewählt werden sollten.

Dieser hohe Tumoranteil ist notwendig, da zudem die Möglichkeit besteht, dass der Tumor bezüglich der zu analysierenden Mutation heterogen sein kann und somit nicht jede Tumorzelle die Mutation trägt.

#### **Benötigte Materialmenge**


- In der Regel wird Material für 2 – 3 Schnitte (5 µm) mit ausreichendem Analyseareal benötigt.
- Größe des Analyseareals: Nach Möglichkeit 0,5 – 1 cm<sup>2</sup>
- Empfohlener Tumoranteil im Analyseareal: ca. 50-80%.
- Die Zugänglichkeit der Gewebeprobe wird wesentlich durch Art und Herkunft sowie durch die Vorbehandlung des Gewebes beeinflusst.

### 5.8.2. Spezifische Hinweise für die FISH-Analysen

Auch für die FISH-Analysen gilt, dass die Einsendung von Blöcken bevorzugt wird. Ist es jedoch notwendig Schnitte einzuschicken so ist darauf zu achten, dass

- Genug Material/zu analysierende Zellen auf dem Schnitt vorhanden sind (mindestens 50 Tumorzellen pro Schnitt/Areal)
- Mindestens vier Schnitte mit einer Schnittdicke von 2µm eingesendet werden (das analysierte Material wird eingerahmt: Ein Schnitt für die erste HE-Färbung, zwei Schnitte für die Analyse und eine Schnitt für die zweite HE-Färbung)
- Die verwendeten Objektträger für eine FISH-Analyse tauglich sind (z. B. können Sie Objektträger der Firma Thermo Scientific, MenzelGläser, Superfrost PLUS (die Oberfläche sollte positiv geladen sein) oder ein vergleichbares Produkt verwenden).

Bearbeiter/in	Freigabe (QMB/Leitung)	Version/Datum	Seite
Prof. Dr. R. Marienfeld	K. Dorsch	Prof. Dr. P. Möller	03/15.04.2014 <b>11 von 13</b>

 <b>Universitätsklinikum Ulm Institut für Pathologie</b>	<b>Verfahrensanweisung</b>		
	<b>Präanalytik</b>		
<b>VA-PA 4</b>			

### 5.8.3. Spezifische Hinweise für die Erregerdiagnostik

Die Erreger-Analysen erfolgen mittels PCR oder Nested-PCR und Agarose-Gelelektrophorese. Für den Nachweis von HPV-Isotypen in FFPE-Gewebe erfolgt eine zusätzliche Sequenzierung der PCR-Produkte. Die Nachweise sind z. T. sehr sensitiv (z. T. können 1-2 Kopien des analysierten Erreger-DNA-Bereichs nachgewiesen werden). Essentiell für den Nachweis der Erreger sind eine gute DNA-Qualität (s. o., „Störfaktoren“) und eine ausreichende Probenmenge (identisch mit den Angaben für Mutationsanalysen).

### 5.8.4. Spezifische Hinweise für die Klonalitätsanalysen (Lymphomdiagnostik)

Mittels der Klonalitätsanalysen kann zwischen dem Vorliegen eines Lymphoms in einer Gewebeprobe oder eines Gemisches an reaktiven Lymphozyten differenziert werden. Dazu werden die variablen Regionen des rearrangierten B-Zell- oder T-Zell-Rezeptors mittels PCR amplifiziert. Die so gewonnenen PCR-Amplifikate werden durch eine hochauflösende Kapillarelektrophorese (Beckman GeXP) analysiert. Auch hier gelten die bereits angesprochenen Aspekte zum Anteil der Tumorzellen (bzw. Anteil der verdächtigen Lymphozyten) in der Probe, zu den Materialmengen sowie zu den möglichen Störfaktoren. Die Nachweisgrenze liegt im Allgemeinen bei ca. 10-20 % (Hier: Anteil eines B- oder T-Zellklons an der gesamten B- oder T-Zellpopulation im Analyseareal).

### 5.8.5. Spezifische Hinweise für die MSI-Analyse

Die Mikrosatelliten-Analyse erfolgt mittels Multiplex-PCR und Kapillar-Elektrophorese (Beckman GeXP). Wie bei allen PCR-basierenden Nachweismethoden in der Molekularpathologie gelten auch hier die oben genannten Kriterien hinsichtlich der möglichen Störgrößen. Es handelt sich um einen sehr empfindlichen Assay. Für die Durchführung der MSI-Analyse wird nur Material von einem Schnitt benötigt (Empfehlung: 5µm mit einem Analyse-Areal von ca. 0,5 – 1 cm<sup>2</sup>). **Folgende Punkte sind wichtig:**

1. Bitte nur Blöcke einsenden (Material bleibt frischer)
2. Immer Normalgewebe als Vergleich mit einsenden (entweder auf demselben Block oder einen weiteren Block beilegen).


## 5.9. Versand der Inspektionsberichte

Inspektionsberichte (Befunde) können per Post, per FAX sowie elektronisch versendet werden.

### *Versand per FAX*

Telefonisch angeforderte Berichte werden nur an bekannte Einsender übermittelt. Voraussetzungen sind zum einen die bereits erfolgte Freigabe des betroffenen Befundes durch den zuständigen Arzt, und zum anderen eine Bestätigung des Empfängers, dass das FAX-Gerät in einem nicht-öffentlichen, gesicherten Umfeld steht (dann kann der betreffende Befund durch das Sekretariat gefaxt werden).

Bearbeiter/in	Freigabe (QMB/Leitung)	Version/Datum	Seite
<i>Prof. Dr. R. Marienfeld</i>	<i>K. Dorsch</i> <i>Prof. Dr. P. Möller</i>	<i>03/15.04.2014</i>	<b>12 von 13</b>

	<b>Universitätsklinikum Ulm Institut für Pathologie</b>	<b>Verfahrensanweisung</b>
<b>VA-PA 4</b>	<b>Präanalytik</b>	

### *Elektronischer Versand*

An einige Einsender werden Befunde auf elektronischem Wege übermittelt (Klinikumsintern über das SAP-System). Die Übermittlung erfolgt über eine gesicherte DFÜ-Verbindung an einen definierten Empfänger. Es erfolgt keine Übermittlung per Email. Unter den elektronisch versendeten Befunden befindet sich ein Vermerk, dass diese Befunde durch einen Facharzt freigegeben wurden und ohne Unterschrift gültig sind.

### **Zudem gilt für die Übermittlung von Inspektionsberichten bzw. Prüfergebnissen:**

- Technische Mitarbeiter (MTA, Naturwissenschaftler) sind nicht befugt Analyseergebnisse zu übermitteln.
- Eine telefonische Übermittlung der Analyseergebnisse erfolgt in der Regel nur durch den befundenen Pathologen.
- Rückfragen bitte an das Sekretariat (0731 500 56320) stellen.

Bearbeiter/in	Freigabe (QMB/Leitung)	Version/Datum	Seite
<i>Prof. Dr. R. Marienfeld</i>	<i>K. Dorsch</i>	<i>Prof. Dr. P. Möller</i>	<i>03/15.04.2014</i> <b>13 von 13</b>